

Aus der Universitäts-Kinderklinik und -Poliklinik
der Freien Universität Berlin
Kommissarischer Leiter: Professor Dr. med. Leonore Ballowitz

Untersuchungen zum Auftreten zellständiger
und humoraler Antikörper nach isologer
Immunisierung mit einem chemisch induzierten
Fibrosarkom der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernd Muzzolini
aus Stuttgart

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548809_0083

Aus der Universitäts-Kinderklinik und -Poliklinik
der Freien Universität Berlin

Komissarischer Leiter: Professor Dr. med. Leonore Ballowitz

Untersuchungen zum Auftreten zellständiger
und humoraler Antikörper nach isologer
Immunisierung mit einem chemisch induzierten
Fibrosarkom der Maus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Bernd Muzzulini
aus Stuttgart

Referent: Professor Dr. med. Burghard Stück

Korreferent: Professor Dr. med. Immo Hoppe



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 22. Oktober 1971

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	7
Tiere	7
Tumoren	7
Immunisierung	8
Gewinnung von immunologisch aktiven Zellen	9
Gewinnung von Antiseren	10
III. Ergebnisse	11
Übertragung zellulärer Immunität	11
Passive Immunisierung mit Antiserum	15
IV. Diskussion	18
V. Zusammenfassung	23
VI. Literatur	24

Einleitung

Das Problem der malignen Zellveränderungen im Organismus hat in der neueren Medizin eine überragende Bedeutung gewonnen. Auch die Immunologen beschäftigen sich seit Jahrzehnten mit dieser Frage. Der Gedanke lag nahe, daß die transformierte Zelle oder das Agens, welches die Transformation bewirkt, die körpereigenen Abwehrmechanismen aktivieren und somit eine Immunreaktion hervorrufen müßte. Gelegentlich beobachtete Spontanremissionen bei Tumoren wiesen auf solche Abwehrvorgänge hin.

Die experimentellen Ergebnisse waren jedoch zunächst nicht verwertbar, da man Tumorummunität nicht von Transplantationsimmunität trennen konnte: übertragenes Tumorgewebe war stets histoinkompatibles Gewebe und rief daher auf jeden Fall eine Abwehrreaktion hervor, ob es nun aus normalen oder neoplastisch veränderten Zellen bestand.

Im Tierexperiment führte erst die Verwendung von Inzuchtstämmen, insbesondere bei Mäusen, zum zweifelsfreien Nachweis tumorspezifischer Antigenität. Die Tiere dieser Stämme sind untereinander genetisch annähernd identisch, Haut- und Gewebstransplantate heilen reaktionslos ein (32, 54, 59). Überträgt man einen Tumor, der in einem Tier eines solchen Stammes gewachsen ist, auf ein anderes Tier desselben Stammes, so sind die nun beobachteten Immunreaktionen allein auf den Tumor zurückzuführen. Die Tumorummunität kann isoliert betrachtet werden, die Transplantationsimmunität entfällt.

Unter diesen Bedingungen gelang es 1953 FOLEY (9) zum erstenmal, mit einem chemisch induzierten Fibrosarkom bei Mäusen eine spezifische Immunität zu erzielen. Wichtige Vorarbeit hatte GROSS (14) geleistet, weitere entscheidende Arbeiten stammen von BALDWIN (3), PREHN (45), KLEIN (21), RÉVÉSZ (48) und OLD (34). Einen klassisch gewordenen Versuch führte KLEIN

durch. Er entfernte in Mäusen gewachsene, chemisch induzierte Primärtumoren durch Amputation des jeweils betroffenen Gliedes, immunisierte die amputierten Tiere mit ihren eigenen Tumorzellen, die er vorher bestrahlt hatte, und machte sie damit gegen eine erneute Inokulation ihres eigenen Tumors (in einer für Kontrolltiere tödlichen Dosis) resistent. Eine Kreuzresistenz der durch dasselbe chemische Carcinogen induzierten Tumoren untereinander bestand nicht (21). Eine Immunreaktion gegen Isoantigene des Transplantates konnte somit ausgeschlossen und die Existenz tumorspezifischer Antigene mit Sicherheit nachgewiesen werden.

Alle genannten Untersucher hatten als Carcinogen das hochwirksame 3-Methylcholanthren verwendet. Später gelang es, auch mit anderen chemischen Carcinogenen - vorwiegend aromatischen Kohlenwasserstoffverbindungen - dasselbe zu erreichen. Unter anderem wurden Dibenzanthrazen (46), Dibenzpyren (33), Dimethylbenzanthrazen (36) und Benzpyren (11, 36) untersucht. Sämtliche durch diese chemischen Carcinogene induzierte Tumoren zeigen ebenfalls eine für den jeweiligen Tumor spezifische Antigenität.

Das 3- oder 20-Methylcholanthren (MC) wird entweder subcutan oder intramuskulär in öliger Lösung bzw. Kristallform implantiert, in der Regel in Dosen von 0,1 bis 1,0 mg. Nach einer Latenzzeit von 3 bis 8 Monaten wächst am Ort der Implantation der Tumor, bei s.c.-Injektion ist es ein Fibrosarkom, bei i.m.-Injektion ein Rhabdomyosarkom (50). Durch Pinzelung der Haut mit MC-Lösung können Hautpapillome hervorgerufen werden (53). Die auf diese Arten erzeugten Tumoren kann man folgendermaßen in Passage halten: Das Tumorgewebe wird mechanisch zerkleinert, eine Aufschwemmung lebender Tumorzellen bereitet und in andere Tiere desselben Inzuchtstammes inokuliert. Dort wachsen diese Zellen in ein bis zwei Wochen zum Tumor heran, der wiederum auf dieselbe Weise übertragen wird. So kann immer weiter verfahren werden, die Tumorzellen können über Jahre in fortlaufender Passage

gehalten werden. Manche Autoren behaupten allerdings, daß nach häufigen Passagen die Antigenität des Tumors sich ändert oder verloren geht (23, 32, 45). OLD konnte jedoch zumindest bei einigen Tumorklinen zeigen, daß Langzeitpassagen keine derartigen Änderungen bewirken (34).

Die aktive Immunisierung der Tiere kann auf verschiedene Art geschehen: Entfernung des wachsenden Tumors bei bestimmter Größe, z.B. Abbinden (3, 9, 45), Exzidieren (17, 45), Amutieren des betroffenen Gliedes (21, 44); durch Gabe von bestrahlten Tumorzellen, die zwar noch antigen wirken, aber nicht mehr vermehrungsfähig sind (21, 48); durch Gabe von sehr kleinen Tumormengen, die der Organismus vernichten kann (34, 48). Mit letztgenannter Methode kann durch ständige Steigerung der gegebenen Zellmengen schließlich eine Hyperimmunisierung erreicht werden. Es kommt zur vollständigen Resistenz gegen den zur Immunisierung verwendeten Tumor (34, 60). Interessant ist dabei, daß im allgemeinen keine Kreuzresistenz der chemisch induzierten Tumoren untereinander besteht (21, 31, 34, 41, 47, 52). Wird bei zwei Geschwistertieren eines Inzuchtstammes zur selben Zeit dasselbe chemische Carcinogen (z.B. MC) implantiert, so entwickeln sich zwei histologisch völlig gleichartige Tumoren. Immunologisch sind es jedoch zwei verschiedene Tumoren mit unterschiedlicher Antigenität. Ein Tier, das gegen einen der beiden Tumoren immunisiert wurde und hochresistent dagegen ist, erliegt einer kleinen Menge des anderen Tumors (34). Dies konnte sogar für zwei Tumoren gezeigt werden, die am selben Tier an verschiedenen Injektionsstellen gewachsen waren (20, 61).

Diese Immunität ist zellgebunden. Die passive Immunisierung bei chemisch induzierten Tumoren gelingt in der Regel durch Übertragung immunologisch kompetenter Zellen. Dafür wurde der Ausdruck "adoptive Immunität" geprägt (32, 37). Man verwendet Lymphknotenzellen (17, 18, 21, 34), Milzzellen (19, 34, 49, 52) oder Peritonealzellen (6, 34) immunisierter Tie-

re - sie werden unter der Bezeichnung "Immunozyten" zusammengefaßt - und überträgt sie auf ungeschützte Tiere, die nunmehr einen Schutz gegenüber den entsprechenden Tumorzellen besitzen. Durch in vitro-Versuche konnte ebenfalls gezeigt werden, daß immunologisch aktive Zellen das Wachstum von Tumorzellkulturen spezifisch zu hemmen vermögen (16, 18, 27, 49), Peritonealzellen insbesondere durch Phagozytose (5).

Dagegen gelang eine passive Immunisierung durch Übertragung von Serum immunisierter Tiere bei chemisch induzierten Tumoren bisher erst zweimal (29, 60). Allerdings war es einige Male in vitro gelungen, einen Serumantikörper bei solchen Tumoren nachzuweisen: mit Fluoreszenz-Techniken (26, 29, 44), Tannin-Erythrozyten-Hämagglutination (44), cytotoxischem Test (60) und einer Zellkolonie-Hemmungs-Technik (18).

Die zweite immunologisch wichtige Gruppe experimenteller Tumoren ist die der virusinduzierten Tumoren und Leukosen. Diese unterscheiden sich in zwei wichtigen Punkten von den chemisch induzierten Tumoren (10, 20, 32, 37, 61):

1. Virusinduzierte Tumoren bedingen eine Kreuzresistenz, alle durch dasselbe Virus hervorgerufenen Tumoren besitzen ein gemeinsames Antigen.
Chemisch induzierte Tumoren bedingen keine Kreuzresistenz, jeder Tumor besitzt ein individualspezifisches Antigen.
2. Virusinduzierte Tumoren rufen einen Serumantikörper hervor, nur bei wenigen läßt sich ein zellulärer Antikörper mit Übertragung adoptiver Immunität nachweisen.
Chemisch induzierte Tumoren bewirken nur in Ausnahmefällen einen Serumantikörper, dagegen ist die Induktion zellulärer Antikörper und die Übertragung adoptiver Immunität die Regel.

OLD (40) differenziert noch etwas mehr und unterscheidet

nach immunologischen Gesichtspunkten drei Kategorien von experimentellen Tumoren:

Tumoren	Charakteristika
1. Chemisch induzierte Tumoren (vorwiegend durch aromatische Kohlenwasserstoffe)	Transplantationsantigene spezifisch für jeden Tumor
2. DNS-Virus induzierte Tumoren (Polyoma, SV 40, Adenovirus)	Transplantationsantigene und Neoantigene sind allen durch dasselbe Virus induzierten Tumoren gemeinsam. Die Tumoren lassen gewöhnlich Virus-Antigen vermissen und geben keine infektiösen Viren ab.
3. RNS-Virus induzierte Tumoren und Leukosen (Geflügel- und Maus-Leukämie/Sarkom-Viren, Mamma-Tumor-Virus)	Transplantationsantigen und Virusantigen sind allen Zellen gemeinsam, welche durch dasselbe Virus transformiert wurden. Zellen geben infektiöse Viren ab.

Der vereinzelte Nachweis von Serumantikörpern bei chemisch induzierten Tumoren warf die Frage auf, ob diese sonst für virusinduzierte Tumoren typischen Antikörper in Wirklichkeit Virus-Antikörper sind, etwa infolge unerkannter Sekundärinfektion oder Aktivierung latent vorhandener Viren, oder ob es echte Tumor-Antikörper sind, die möglicherweise öfter vorhanden sind als bisher bekannt, und die sich nur infolge zu wenig empfindlicher Methoden dem Nachweis entziehen.

STÜCK (60) hatte 1966 einen Serumantikörper bei einem chemisch induzierten Tumor in vivo und in vitro nachgewiesen. Er hatte dabei einen methylcholanthreninduzierten Tumor

BALB/c♀ Meth A-Ascites verwendet, der in Langzeitpassage in BALB/c-Mäusen gehalten wurde, damit ein Hyperimmunserum in BALB/c-Mäusen erzeugt und mit diesem Antiserum unbehandelte BALB/c-Mäuse erfolgreich passiv immunisiert. Im cytotoxischen Test reagierte dieses Antiserum mit den spezifischen Tumorzellen, nicht aber mit den bekannten Antigen-Systemen von Maustumoren und -leukosen.

Um die Frage nach der Tumorspezifität dieses von STÜCK nachgewiesenen Serumantikörpers weiter zu klären, wird in der vorliegenden Arbeit mit demselben Tumor experimentiert und gezeigt, daß neben dem Serumantikörper ein spezifischer zellständiger Antikörper induzierbar ist und damit ebenfalls eine passive Immunität übertragen werden kann. Zudem wird der Versuch von STÜCK reproduziert und ein Vergleich der humoralen und der zellständigen Antikörper hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und Spezifität angestellt. Es besteht Übereinstimmung.

Material und Methoden

Tiere

Verwendet wurden Inzuchtmäuse der Stämme BALB/c, C57Bl/6 und ihre F₁-Hybriden (BALB/c x C57Bl/6, C57Bl/6 x BALB/c). Die Mäuse befanden sich in einem Alter von 6 bis 12 Wochen und hatten ein Gewicht von etwa 20 Gramm. Sie erhielten standardisierte Kost (ALTROMIN) und Wasser ad libitum.

Tumoren

1. BALB/c♀ Meth A-Ascites in der 334. bis 438. Passage.
Der Primärtumor wurde 1962 durch eine Subkutan-Injektion von 0,1 mg 3-Methylcholanthren in weiblichen BALB/c-Mäusen induziert (34, 60). Innerhalb von drei bis acht Monaten wuchsen bei 90 % der Tiere an der Injektionsstelle Fibrosarkome, die in Passagen weiter übertragen wurden. Bei einer dieser Tumorlinien kam es nach wenigen Passagen zum Auftreten eines Ascites. Diese Ascitesvariante wurde bis heute in ununterbrochener Reihenfolge in Passage gehalten. Die Asciteszellen sind mit den Sarkomzellen immunologisch identisch, sie erzeugen eine gemeinsame Resistenz, mit den Asciteszellen kann durch eine Subkutan-Injektion wieder ein solides Fibrosarkom erzeugt werden.
2. Andere Maus-Tumoren zur Prüfung auf Kreuzresistenz.
 - a) C57Bl/6♀ ERLD : Das ist eine Leukose, die in weiblichen C57Bl/6-Mäusen nach Röntgenbestrahlung aufgetreten war. Die Tumorzellen enthalten neben anderen das TL-Antigen (7, 8, 35).
 - b) AKR♀ S11 : Eine Spontanleukose bei AKR-Mäusen, verursacht durch das GROSS-Virus. Das G-Antigen sitzt an der Zelloberfläche (15, 39, 51).
 - c) C57Bl EL4 : Ein durch DMBA induzierter Leukose-Ascites

bei C57Bl/6-Mäusen, die Tumorzellen besitzen an der Zelloberfläche das E-Antigen (2, 12).

Alle Tumoren werden in Langzeitpassage gehalten.

Immunisierung

1. BALB/c x C57Bl/6♂-Mäuse, C57Bl/6 x BALB/c♂-Mäuse und C57Bl/6♀-Mäuse wurden mit dem Tumor BALB/c♀ Meth A-Ascites immunisiert. Jede Gruppe umfaßte 5 bis 10 Tiere. Nach folgendem Schema wurde verfahren: $0,015 \times 10^6$ Tumorzellen subkutan, nach drei Wochen $0,05 \times 10^6$ Tumorzellen subkutan, nach weiteren zwei Wochen $0,05 \times 10^6$ Tumorzellen intraperitoneal, dann in zweiwöchigen Abständen 0,1, 0,3, 1,0, 5,0 usw. bis maximal 200×10^6 Tumorzellen intraperitoneal. Die Tumorzellen wurden der laufenden Passage entnommen durch Punktion des reifen Ascites. Vor der Injektion wurden die Zellen in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, in der Thoma-Zählkammer ausgezählt, mit Trypanblau auf Vitalität geprüft und mit physiologischer NaCl-Lösung auf die gewünschte Verdünnung eingestellt.

Da der Versuch, BALB/c-Mäuse in genügender Zahl zu immunisieren, wiederholt fehlschlug, mußten die weniger empfindlichen F₁-Hybriden von BALB/c und C57Bl/6 verwendet werden. Sie besitzen Histokompatibilität mit BALB/c-Gewebe und sind daher zur Immunisierung mit einem BALB/c-Tumor ebenfalls geeignet (34, 54).

2. BALB/c-Mäuse wurden gegen die Tumoren C57Bl/6♀ ERLD, AKR♀ S11 und C57Bl EL4 immunisiert. Da es sich hierbei um histoinkompatibles Gewebe handelte, konnte mit je $0,5 \times 10^6$ Tumorzellen subkutan begonnen und bei gleichen Zeitabständen wie oben die Dosis rascher gesteigert werden. Tumorzellen erhielt man aus den vergrößerten Milzen, die mit feinen Scheren zerkleinert und in physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt wurden, oder durch Punk-

tion des Ascites.

Gewinnung von immunologisch aktiven Zellen (Immunozyten)

Unter "Immunozyten" versteht man nach BENNETT (6) Zellen immunisierter Tiere, die in der Lage sind, das Wachstum desjenigen Tumors, der zur Immunisierung verwendet wurde, in vivo und in der entsprechenden Tumorkultur in vitro zu hemmen. Es handelt sich vorwiegend um Lymphozyten und Makrophagen. KLEIN (21) zeigte dies für MC-Tumoren zum erstenmal mit Lymphknotenzellen; OLD (34), JANOWSKY (19), ROSENAU (49), BARD (4) u.a. mit Milzzellen (Milzzellen bestehen bei Mäusen zu 90 % aus Lymphozyten (49)). Eine dritte Methode ist die Verwendung von Peritonealzellen, erstmals von OLD (34) angegeben, von BENNETT (5, 6) weiterentwickelt. Sie hat den großen Vorteil, daß man zur Gewinnung der Zellen die wertvollen immunisierten Tiere nicht töten muß und mehrmals Zellen gewinnen kann. Das Peritonealdialysat besteht bei der Maus zu etwa 50 % aus Makrophagen, 40 % Lymphozyten und 10 % anderen zellulären Elementen (6).

Wir verfahren mit geringen Modifikationen nach der Methode von BENNETT (5): Den hochimmunisierten Mäusen wird 1 ml 3 %ige Stärkelösung intraperitoneal gespritzt, um eine vermehrte Zelleinwanderung in die Bauchhöhle zu erreichen. Zwei bis drei Tage danach wird der Bauch glatt rasiert, desinfiziert und in oberflächlicher Äthernarkose mit einer Injektionskanüle perforiert. Durch die entstandene Öffnung wird ein feiner Polyvinyl-Katheter eingeführt und 4 ml einer physiologischen NaCl-Lösung eingespritzt, die pro ml 0,5 E Heparin und 100 E Penicillin enthält. Anschließend läßt man die nun mit Zellen angereicherte Flüssigkeit durch denselben Schlauch ablaufen. Der Zellgehalt wird in der Thoma-Zählkammer bestimmt. Mit einer frisch angesetzten 0,2 %igen Trypanblau-Lösung, die nur von toten Zellen aufgenommen wird, muß die Vitalität geprüft werden. Die Zahl der toten Zellen

soll unter 10 % liegen.

Gewinnung von Antiseren

Die immunisierten Mäuse werden am 10. und 12. Tag nach der 4. Tumordinjektion aus der Schwanzvene geblutet. Nach jeder weiteren Tumorzell-Gabe wird nun je am 10. und 12. Tag Blut aus der Schwanzvene gewonnen. Nach Absetzen des Blutkuchens bei Zimmertemperatur wird zentrifugiert, das Serum abpipetiert und bei -20 Grad Celsius eingefroren.

E r g e b n i s s e

A. Übertragung zellulärer Immunität

Weibliche BALB/c-Mäuse wurden subkutan in den Nacken mit einem Gemisch aus BALB/c♀ Meth A-Ascites-Zellen und Peritonealzellen verschiedener immunisierter und nicht immunisierter Mäuse inokuliert. Beide Zellarten waren unmittelbar vor der Injektion nach beschriebener Methode gewonnen, auf Vitalität geprüft und in Petrischalen vermischt worden. Die Tiere wurden danach in dreitägigem Abstand auf Tumorstadium und Milzschwellung kontrolliert.

Es waren zwei Vorversuche notwendig, um die geeignete Tumordosis zu ermitteln.

1. Vorversuch

Jede Maus bekam subkutan $0,2 \times 10^6$ BALB/c♀ Meth A-Ascites-Zellen und $3,0 \times 10^6$ Peritonealzellen.

Peritonealzellen folgender immunisierter Mäuse wurden verwendet:

1. BALB/c x C57Bl/6♂ anti BALB/c♀ Meth A-Ascites
2. C57Bl/6♀ anti BALB/c♀ Meth A-Ascites
3. BALB/c♂ anti C57Bl/6♀ ERLD

Überlebensrate von BALB/c♀-Mäusen nach Injektion von BALB/c♀ Meth A-Ascites-Zellen u. Peritonealzellen

Herkunft der Peritonealzellen		Zahl der BALB/c Mäuse	Zahl der überlebenden Mäuse	mittlere Überlebensdauer der gestorbenen Mäuse (Tage)
Genotyp	immunisiert mit			
1. BALB/c x C57Bl/6♂	BALB/c♀ Meth A-Asc.	5	5	-
2. C57Bl/6♀	BALB/c♀ Meth A-Asc.	4	4	-
3. BALB/c♂	C57Bl/6♀ ERLD	5	3	31,0
4. Kontrollgruppe	ohne Peritonealzellen	5	2	29,3

Es zeigte sich, daß alle Tiere überlebten, die Peritonealzellen von BALB/c♀ Meth A-Ascites-immunisierten Mäusen erhalten hatten, sowohl von jenen ohne (Gruppe 1) als auch von jenen mit (Gruppe 2) Histoinkompatibilitäts-Antikörpern. Diese H2-Antikörper entstehen bei Kontakt des Immunsystems mit Gewebe aus einem fremden Stamm. Bei Mäusen besitzt jeder Inzuchtstamm seine charakteristischen H2-Antigene (13, 54). Die Tumorzellen BALB/c♀ Meth A-Ascites enthalten einmal die Antigen-Komponente des Tumors "Meth A" (Tumorantigen), zum anderen die Antigen-Komponente des Inzuchtstammes BALB/c (H2-Antigen). Bei der Immunisierung von C57Bl/6-Mäusen mit BALB/c♀ Meth A-Ascites wird hauptsächlich das stärkere H2-Antigen wirksam werden, bei der Immunisierung von BALB/c-Mäusen oder ihren F₁-Abkömmlingen dagegen entfällt die Inkompatibilität im H2-System und das Tumorantigen wird allein wirksam.

In der Gruppe 3, deren Tiere gegen einen anderen Tumor gerichtete Peritonealzellen erhalten hatten, starben 2 von 5 Mäusen, in der Kontrollgruppe ohne Peritonealzellen starben 3 von 5 Mäusen.

Da der Unterschied zwischen den mit spezifischen Immunzellen behandelten Tieren und den Kontrollen noch nicht deutlich genug war, wurde in einem weiteren Vorversuch die Tumordosis erhöht.

2. Vorversuch

Jede Maus bekam subkutan $0,5 \times 10^6$ BALB/c♀ Meth A-Ascites-Zellen und $2,5 \times 10^6$ Peritonealzellen. Die Gruppen 1 und 2 waren dieselben wie im ersten Vorversuch, die Gruppe 3 wurde weggelassen, die Tiere der Kontrollgruppe erhielten diesmal Peritonealzellen normaler, nicht immunisierter BALB/c x C57Bl/6♂-Mäuse.

Überlebensrate von BALB/c μ -Mäusen nach Injektion von
BALB/c μ Meth A-Ascites-Zellen und Peritonealzellen

Herkunft der Peritonealzellen		Zahl der BALB/c Mäuse	Zahl der über- leben- den Mäuse	mittlere Überlebens- dauer der gestorbenen Mäuse (Tage)
Genotyp	immunisiert mit			
1. BALB/c x C57Bl/6 σ	BALB/c μ Meth A-Asc.	5	5	-
2. C57Bl/6 μ	BALB/c μ Meth A-Asc.	5	5	-
3. BALB/c x C57Bl/6 σ	-	5	1	22,5

In den Gruppen 1 und 2 überlebten alle Tiere, in der Kontrollgruppe starben 4 von 5 Mäusen. Damit war die geeignete Tumordosis gefunden, sie lag bei $0,5 \times 10^6$ Zellen.

Hauptversuch

Jede Maus bekam subkutan $0,5 \times 10^6$ BALB/c μ Meth A-Ascites-Zellen und $2,0 \times 10^6$ Peritonealzellen, das entspricht einem Verhältnis 1 : 4.

Es wurden Peritonealzellen folgender immunisierter Mäuse verwendet:

1. BALB/c x C57Bl/6 σ anti BALB/c μ Meth A-Ascites
2. C57Bl/6 μ anti BALB/c μ Meth A-Ascites
3. BALB/c σ anti C57Bl/6 μ ERLD
4. BALB/c σ anti AKR μ S11
5. BALB/c σ anti C57Bl/6 σ -Milz
6. C57Bl/6 σ anti BALB/c σ -Milz

Hinzu kam eine Kontrollgruppe, deren Tiere Peritonealzellen nicht immunisierter C57Bl/6 x BALB/c σ -Mäuse erhielten.

Überlebensrate von BALB/c♀-Mäusen nach Injektion von
BALB/c♀ Meth A-Ascites-Zellen und Peritonealzellen

Herkunft der Peritonealzellen		Zahl der BALB/c Mäuse	Zahl der über- leben- den Mäuse	mittlere Überlebens- dauer der gestorbenen Mäuse (Tage)
Genotyp	immunisiert mit			
1. BALB/c x C57B1/6♂	BALB/c♀ Meth A-Asc.	5	5	-
2. C57B1/6♀	BALB/c♀ Meth A-Asc.	5	5	-
3. BALB/c♂	C57B1/6♀ ERLD	2	0	22,5
4. BALB/c♂	ARK♀ S11	5	1	24,8
5. BALB/c♂	C57B1/6♂ -Milz	5	0	27,2
6. C57B1/6♂	BALB/c♂ -Milz	5	5	-
7. C57B1/6 x BALB/c♂	-	10	3	25,2

Es überlebten alle Tiere der Gruppen 1, 2 und 5. Zum Teil kam es bei ihnen zu einem geringen Tumorwachstum, doch stets mit spontaner Rückbildung. Vorübergehende Milzschwellungen traten ebenfalls auf.

In den anderen Gruppen kam es bei der Mehrzahl der Tiere zu einem progressiven Tumorwachstum mit starker Splenomegalie. Die Überlebensquoten und Überlebenszeiten sind im einzelnen der obenstehenden Tabelle zu entnehmen.

Offensichtlich bieten die Peritonealzellen, die den Mäusen der Gruppen 1, 2 und 6 gegeben wurden, einen Schutz vor dem Tumor BALB/c♀ Meth A-Ascites. In Gruppe 1 handelt es sich um histokompatible Immunzellen, die Schutzwirkung kommt hierbei durch einen spezifischen, zellständigen Tumor-Antikörper zustande. In Gruppe 6 wurden Peritonealzellen von C57B1/6-Mäusen verwendet, die mit normalem BALB/c-Gewebe immunisiert

worden waren. Die Schutzwirkung beruht hier ausschließlich auf einem H2-Antikörper. In Gruppe 2 liegt ebenfalls ein H2-Antikörper vor, der für die Schutzwirkung vornehmlich verantwortlich zu machen ist. Inwieweit ein spezifischer Tumor-Antikörper beteiligt ist, läßt sich nicht abgrenzen.

Histokompatible Immunzellen, die gegen andere Tumoren oder Fremdgewebe gerichtet sind, bieten keinen Schutz vor dem BALB/c φ Meth A-Ascites-Tumor, es besteht keine Transplantationsimmunität (Gruppe 3 des ersten Vorversuches, Gruppen 3, 4 und 5 des Hauptversuches).

Bei der Kontrollgruppe wurden histokompatible Peritonealzellen unbehandelter Mäuse gegeben, es starben 7 von 10 Tieren, so daß auch hier im Vergleich zur Gruppe 1 kein eindeutiger spezifischer Schutz besteht.

B. Passive Immunisierung mit Antiserum

Weibliche BALB/c-Mäuse bekamen jeweils 4 x 0,5 ml Serum in die Schwanzvene injiziert, die 2., 3. und 4. Injektion erfolgte im Abstand von 24, 30 und 48 Stunden nach der Erstinjektion. Die Tumordinokulation geschah zwischen der 2. und 3. Seruminjektion durch Gabe von BALB/c φ Meth A-Ascites-Zellen intraperitoneal.

Vier verschiedene Hyperimmunseren und ein Normalserum standen zur Verfügung. Zweimal drei Gruppen zu je vier Mäusen wurden gebildet. Größere Kollektive waren nicht möglich, da die Menge des zur Verfügung stehenden Serums begrenzt war.

1. Versuch

Im ersten Ansatz erhielten die Tiere $0,5 \times 10^6$ Tumorzellen. Dazu wurden die folgenden drei Antiseren gegeben:

1. C57Bl/6 x BALB/c♂ anti BALB/c♀ Meth A-Ascites-Serum
2. BALB/c♀ anti ARK♀ S11-Serum
3. BALB/c♂ anti C57Bl EL4-Serum

Überlebensrate von BALB/c♀-Mäusen nach Injektion
von BALB/c♀ Meth A-Ascites-Zellen und Antiserum

Herkunft des Antiserums		Zahl der BALB/c Mäuse	Zahl der über- leben- den Mäuse	mittlere Überlebens- dauer der gestorbenen Mäuse (Tage)
Genotyp	immunisiert mit			
1. C57Bl/6 x BALB/c♂	BALB/c♀ Meth A-Asc.	3	1	24,5 (20,29)
2. BALB/c♀	ARK♀ S11	3	0	15,0 (15,15,15)
3. BALB/c♂	C57Bl EL4	4	0	15,7 (14,16,16,17)

Alle Mäuse, die ein unspezifisches Antiserum (Gruppen 2 und 3) erhalten hatten, entwickelten einen ausgeprägten hämorrhagischen Ascites und starben zwischen dem 14. und 17. Tage post injectionem. Hingegen zeigte sich bei den mit spezifischem BALB/c♀ Meth A-Ascites-Antiscrum behandelten Tieren der Gruppe 1 eine deutlich längere Überlebenszeit. Zwar bekamen alle drei Mäuse einen Ascites, doch kam es bei einer zur vollständigen Remission, die beiden anderen starben erst nach 20 und 29 Tagen. Obgleich bereits ein deutlicher Unterschied zu den Kontrollgruppen vorhanden war, schien die Tumordosis zu stark zu sein. In einem weiteren Ansatz mit demselben spezifischen Antiserum und weiteren Kontrollseren wurde die Tumorzellzahl verringert.

2. Versuch

Im zweiten Ansatz erhielten die Tiere $0,3 \times 10^6$ Tumorzellen.

Dazu wurden die folgenden drei Seren gegeben:

1. C57Bl/6 x BALB/c♂ anti BALB/c♀ Meth A-Ascites-Serum
2. BALB/c♂ anti C57Bl/6♀ ERLD-Serum
3. BALB/c x C57Bl/6♂ -Normalserum

Überlebensrate von BALB/c♀-Mäusen nach Injektion von BALB/c♀ Meth A-Ascites-Zellen und Antiserum

Herkunft des Antiserums		Zahl der BALB/c Mäuse	Zahl der überlebenden Mäuse	mittlere Überlebensdauer der gestorbenen Mäuse (Tage)
Genotyp	Immunisiert mit			
1. C57Bl/6 x BALB/c♂	BALB/c♀ Meth A-Asc.	4	3	<u>29,0</u>
2. BALB/c♂	C57Bl/6♀ ERLD	4	0	<u>15,7</u> (15,15,16,17)
3. BALB/c x C57Bl/6♂	-	4	0	<u>19,7</u> (19,19,20,21)

Bei dieser Versuchsanordnung mit geringerer Tumordosis vermittelte das spezifische BALB/c♀ Meth A-Ascites-Antiserum einen fast vollständigen Schutz vor dem BALB/c♀ Meth A-Ascites-Tumor. Von vier Tieren der Gruppe 1 überlebten drei ohne Anzeichen eines Tumorwachstums, eines starb nach 29 Tagen, es wies eine starke Milzschwellung auf, ein Ascites hatte sich nicht entwickelt. Die Tiere der Gruppen 2 und 3, die ein unspezifisches Antiserum bzw. ein Normalserum erhalten hatten, bekamen alle einen Ascites und starben zwischen dem 15. und 21. Tag nach der Tumordinjektion.

D i s k u s s i o n

Für den chemisch induzierten BALB/c μ Meth A-Ascites-Tumor hatte STÜCK (60) die Bildung eines humoralen Antikörpers nachgewiesen. Humorale Antikörper treten gewöhnlich nur bei virusinduzierten Tumoren auf (10, 37). In den vorliegenden Versuchen wird gezeigt, daß nach Immunisierung mit dem genannten Tumor neben dem humoralen Antikörper ein zellständiger Antikörper auftritt. Es können immunologisch aktive Zellen (Immunozyten) gewonnen und damit eine "adoptive Immunität" übertragen werden. Zellständige Antikörper und "adoptive Immunität" sind charakteristisch für chemisch induzierte Tumoren (34, 47, 37).

Es gilt hier zu erörtern, ob die nachgewiesenen humoralen und zellständigen Antikörper durch ein Virus hervorgerufen sein können, oder ob es sich um reine Tumor-Antikörper eines chemisch induzierten Tumors handelt.

In gewissen Fällen kann die Bildung eines zellständigen Antikörpers auch durch virusinduzierte Tumoren der Maus hervorgerufen werden. Das wichtigste Beispiel dafür sind die GROSS-Virus-Tumoren bzw. -Leukosen, mit denen sich sowohl Antiseren als auch Immunozyten induzieren lassen (22, 37, 51). Das GROSS-Virus ist unter Labormäusen weit verbreitet. Gesunde wie tumortragende Mäuse können damit infiziert sein (10, 15, 39). Zunächst fand man das GROSS-Antigen (G-Antigen) in Leukosezellen und im normalen Lymphgewebe solcher Mäusestämme, die eine hohe Spontanleukoserate aufwiesen. Diese wurden als G-positive Stämme bezeichnet, dazu gehören z.B. AKR, C58 (15, 39, 51). Später fand man das G-Antigen auch in Leukosezellen und nichtlymphoiden Tumoren in bestimmten G-negativen Stämmen wie BALB/c und A (39). Mäuse aus G-negativen Stämmen tragen das G-Antigen nicht am normalen Lymphgewebe und haben eine niedrige Spontanleukoserate. So konnte OLD (40) das G-Antigen bei methyl-

cholanthreninduzierten Fibrosarkomen in G-negativen BALB/c-Mäusen nachweisen, während es im Normalgewebe der tumortragenden Mäuse nicht vorhanden war. Hier muß eine Sekundärinfektion angenommen werden. Weiterhin zu berücksichtigen ist eine nur indirekt nachweisbare Form der Virusinfektion. In methylcholanthreninduzierten Primärtumoren bei C57Bl/6-Mäusen, die hochresistent gegen das GROSS-Virus sind und einen natürlichen G-Antikörper im Blut besitzen (1), lassen sich keine G-Antigene oder Viruspartikel entdecken. Erst wenn man die Tumorzellen in Kultur züchtet, sie gewissermaßen vom Immunsystem ihres Wirtes isoliert, vermehren sich die Viren, das G-Antigen läßt sich nun nachweisen (40).

Der BALB/c η Meth A-Ascites-Antikörper ist jedoch nicht identisch mit einem G-Antikörper und enthält keine G-Komponente. Dafür sprechen folgende Beobachtungen:

1. G-Antiserum reagiert im cytotoxischen Test nicht mit den BALB/c η Meth A-Ascites-Zellen (60). Im umgekehrten Ansatz von BALB/c η Meth A-Ascites-Antiserum gegen G-Antigen zeigt sich ebenfalls keine Reaktion. Damit kann auch das Vorhandensein eines natürlichen G-Antikörpers - wie er im obengenannten Beispiel bei C57Bl/6-Mäusen auftritt - ausgeschlossen werden.
2. OLD (39) konnte bei Absorptionsversuchen mit einem G-Antiserum kein G-Antigen an den BALB/c η Meth A-Ascites-Zellen nachweisen.
3. Die BALB/c η Meth A-Ascites-Zellen werden seit Jahren ständig auf das Auftreten von G-Antigen kontrolliert, da bei dem ubiquitären Vorkommen des GROSS-Virus eine Sekundärinfektion durchaus im Bereich des Möglichen liegt. Bis heute konnte kein G-Antigen entdeckt werden (62).
4. Die Tierversuche der vorliegenden Arbeit bestätigen diese serologischen Ergebnisse. G-Immunozyten und G-Antisera schützen nicht vor dem BALB/c η Meth A-Ascites-Tumor.

Neben dem G-Antigen kennt man noch eine Reihe anderer tumor- und leukosespezifischer Antigensysteme (10, 37, 59, 61), die mit Hilfe des cytotoxischen Testes differenziert worden sind und vorwiegend in Abhängigkeit von einem zur Induktion verwendeten Virus auftreten. Im einzelnen sind dies folgende Antigensysteme: FRIEND-MOLONEY-RAUSCHER(FMR)-Antigene (38), GRAFFI-Antigen (42), Mamma-Leukose(ML)-Antigen (58), Thymus-Leukose(TL)-Antigen (8), E-Antigen (2). Die Möglichkeit, daß eines dieser Antigene an der BALB/c♀ Meth A-Ascites-Zelle sitzt und den gefundenen Serumantikörper induziert haben könnte, wurde ausgeschlossen. Alle diese Antigene reagieren in vitro nicht mit dem BALB/c♀ Meth A-Ascites-Antiserum, ebenso wenig die entsprechenden Antiseren mit den BALB/c♀ Meth A-Ascites-Zellen (60). Für das TL-Antigen und das E-Antigen sind bisher keine auslösenden Viren gefunden worden (2, 40). Da diese beiden Antigene u.a. auch bei chemisch induzierten Tumoren nachgewiesen werden können, wurden in den vorliegenden Tierversuchen die Leukose C57Bl/6♀ ERL1 (TL+) und die Leukose C57Bl EL4 (E+) mit einbezogen. In Übereinstimmung mit den serologischen Ergebnissen gelang eine passive Immunübertragung nicht.

Nach dem Ausschluß der bekannten Antigensysteme als Induktoren des BALB/c♀ Meth A-Ascites-Antikörpers muß ein anderes, möglicherweise bisher unbekanntes ursächliches Antigen vorhanden sein. Zwei Schlußfolgerungen sind möglich:

1. Es handelt sich um ein Antigen eines chemisch induzierten Tumors, welches sowohl einen spezifischen zellständigen Antikörper als auch einen spezifischen Serumantikörper induzieren kann.
2. Es handelt sich um ein Virus-Antigen, das sich von den bisher bekannten Antigensystemen unterscheidet.

Dabei muß folgende wichtige Beobachtung Berücksichtigung finden. Es zeigte sich, daß das BALB/c♀ Meth A-Ascites-Antiserum eine cytotoxische Aktivität gegenüber einigen Tumoren

verschiedener Genese besitzt. Die serologisch nachweisbaren Kreuzreaktionen waren unabhängig von der Art der Tumorinduktion, dem biologischen Verhalten des Tumors oder dem verwendeten Inzuchtstamm (60). Eine Antigengemeinschaft solch verschiedenartiger Tumoren ließe sich am ehesten durch ein Virus erklären. Für die Langzeitpassagen - in der auch der BALB/c_q Meth A-Ascites-Tumor vorliegt - wäre eine Sekundärinfektion anzunehmen, bei Primärtumoren oder Kurzzeitpassagen wäre an die Aktivierung eines latent vorhandenen Virus durch das Carcinogen zu denken. Es ist bekannt, daß chemische Carcinogene eine Immundepression machen (28, 45, 55, 56). Unter solchen Bedingungen können latent vorhandene Viren sich vermehren und antigen wirksam werden. Es kommt dann zur sogenannten "Antigen-Konversion" (57) der Tumorzelle, das Virus wird in die Zelle integriert, wirkt dort weiter antigen und verändert somit die Antigenstruktur der Wirtszelle. Dabei ist es durchaus möglich, daß nunmehr zwei Antigen-Spezifitäten an der Zelle sitzen, die beide eine Immunreaktion hervorrufen können, sei es in Form eines Serumantikörpers oder in Form eines zellulären Antikörpers. PASTERNAK (43) hat in GRAFFI-Leukose-Immunseren der Maus Antikörper gegen virale Antigene und Antikörper gegen neue Zellantigene nachgewiesen, die nicht identisch sind. OBOSHI u.a. (30) kamen zu einem ähnlichen Ergebnis bei einer FRIEND-Virus-Leukose.

Seit der Entdeckung spezifischer Antigene bei chemisch induzierten Tumoren wird die Frage diskutiert, inwieweit bei deren Entstehung Viren beteiligt sind. KREBS (24) gelang es, mit einem zellfreien Extrakt aus MC-induzierten Primärtumoren bei NMRI-Mäusen ein onkogenes Agens zu übertragen, das nach sechsmaliger zellfreier Passage über gesunde Mäuse noch in der Lage war, bei neugeborenen NMRI-Mäusen Adenokarzinome hervorzurufen. Kontrollen mit normalen NMRI-Gewebsextrakten ergaben kein Tumorstadium. KREBS schloß, er habe aus dem Primärtumor ein Polyoma-Virus übertragen, wel-

ches latent in NMRI-Mäusen vorhanden sei und durch MC bzw. MC-transformierte Zellen aktiviert worden sein müsse. Nun scheint dieses onkogene Agens nicht allein durch MC-Tumoren aktiviert zu werden, sondern auch seinerseits eine Rückwirkung auf die Entwicklung der MC-Tumoren zu haben. In einer weiteren Arbeit zeigte KREBS (25), daß der zellfreie Extrakt aus MC-Primärtumoren die Tumorinduktionszeit nach MC-Implantation verkürzt. Wie weit allerdings dieses onkogene Agens an der Determinierung der Antigenstruktur der MC-Tumorzellen beteiligt ist, bleibt ungeklärt.

OETTGEN (31) arbeitete ebenfalls mit zellfreien Extrakten. Extrakte aus MC-Tumoren und DMBA-Tumoren bei Inzuchtmeerschweinchen dienten ihm zur Immunisierung isolierter Tiere. Es kam zu einer Transplantationsresistenz und zu einer verzögerten Hautreaktion vom Tuberkulintyp, beides streng spezifisch nur für den zur Immunisierung verwendeten Tumor. Unter 13 MC-Tumoren trat keine Kreuzresistenz auf. Auf Grund der fehlenden Kreuzresistenz ist es sehr unwahrscheinlich, in dem übertragenen löslichen Tumorantigen ein Virus zu vermuten. Alle bisher bekannten onkogenen Viren zeigen nämlich eine Kreuzresistenz (10, 40, 50).

Anhand der Arbeiten von KREBS und von OETTGEN wird deutlich, wie wenig sich bisher trotz einiger Teilergebnisse über die Rolle der Viren bei der Entstehung chemisch induzierter Tumoren und ihrer Antigenmuster aussagen läßt. So kann auch für den BALB/cq Meth A-Ascites-Tumor nicht endgültig entschieden werden, ob ein Virus beteiligt ist und das Antigenmuster der Tumorzelle mitbestimmt. Dafür spricht das Auftreten eines Serumantikörpers, dessen cytotoxische Aktivität gegen verschiedenartige Tumorzellen gerichtet ist. Auch spricht das Auftreten eines zellständigen Antikörpers und die Übertragung einer adoptiven Immunität, beides typisch für chemisch induzierte Tumoren, nicht unbedingt gegen eine Virusbeteiligung. Zellständige Antikörper und adoptive Immunität können auch bei einzelnen virusinduzierten Tumoren beobachtet werden (37, 51).

Z u s a m m e n f a s s u n g

Ein chemisch induzierter Tumor bei BALB/c-Inzuchtmäusen wird auf Antigenität und Antikörperbildung untersucht. Es handelt sich um das durch 3-Methylcholanthren hervorgerufene Fibrosarkom BALB/c♀ Meth A und dessen Ascitesvariante BALB/c♀ Meth A-Ascites. Nachdem es 1966 bereits gelungen war, die Bildung eines tumorspezifischen humoralen Antikörpers für diesen Tumor nachzuweisen, wird in der vorliegenden Arbeit gezeigt, daß nach aktiver Immunisierung mit BALB/c♀ Meth A-Ascites-Zellen auch ein tumorspezifischer zellständiger Antikörper auftritt. Durch Übertragung immunologisch kompetenter Zellen aus dem Peritonealdialysat (Lymphozyten und Makrophagen) immunisierter BALB/c-F₁-Hybriden kann eine passive Immunisierung, unbehandelter BALB/c-Mäuse gegen den Tumor erreicht werden. Es handelt sich um eine "adoptive Immunität". Eine Kreuzresistenz mit verschiedenen radiologisch, chemisch oder durch Viren induzierten Maus-Tumoren bzw. -Leukosen konnte in vivo nicht beobachtet werden. Vergleichende Tierversuche mit dem humoralen und dem zellständigen Antikörper ergaben Übereinstimmung der Spezifität. Nur das tumorspezifische Antiserum und die tumorspezifischen Immunozyten schützen vor dem zur Antikörperinduktion verwendeten BALB/c♀ Meth A-Ascites-Tumor. Durch andere bekannte Mäusetumor-Antigensysteme induzierte Antiseren und Immunozyten waren ohne Wirkung.

L i t e r a t u r

1. AOKI, T., E.A. BOYSE, and L.J. OLD:
Occurrence of natural antibody to the G (Gross)
leukemia antigen in mice.
Cancer Res. 26, 1415-1419 (1966).
2. AOKI, T., B. STÜCK, L.J. OLD, U. HÄMMERLING, and E. de
HARVEN:
E antigen: a cell-surface antigen of C57Bl leukemias.
Cancer Res, 30, 244-251 (1970).
3. BALDWIN, R.W.:
Immunity to methylcholanthrene-induced tumours in
inbred rats following atrophie and regression of the
implanted tumours.
Brit. J. Cancer 9, 652-657 (1955).
4. BARD, D.S., and Y.H. PILCH:
The role of the spleen in immunity to a chemically
induced sarcoma in C3H mice.
Cancer Res. 29, 1125-1131 (1969).
5. BENNETT, B., L.J. OLD, and E.A. BOYSE:
The phagocytosis of tumor cells in vitro.
Transplantation 2, 183-202 (1964).
6. BENNETT, B.:
Specific suppression of tumor growth by isolated
peritoneal macrophages from immunized mice.
J. Immunol. 95, 656-664 (1965).
7. BOYSE, E.A., L.J. OLD, and S. LUELL:
Genetic determination of the TL (thymus leukemia)
antigen in mouse.
Nature (Lond.), 201, 779 (1964).
8. BOYSE, E.A., L.J. OLD, and E. STOCKERT:
The TL (thymus leukemia) antigen: a review.
in: Immunopathology 4th Intern. Symp., pp. 23-40.
Basel und Stuttgart: Schwabe u. Co. 1966.

9. FOLEY, E.J.:
Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin.
Cancer Res. 13, 835-837 (1953).
10. GALLMEIER, W.M., und OETTGEN, H.F.:
Tumorimmunologie. Virusinduzierte Tumoren.
Dtsch. med. Wschr. 93, 1114-1118 (1968).
11. GLOBERSON, A., and M. FELDMANN :
Antigenic specificity of benzo(a)pyrene-induced sarcomas.
J. Nat. Cancer Inst. 32, 1229-1243 (1964).
12. GORER, P.A., and D.B. AMOS:
Passive immunity in mice against C57Bl leukemia
E.L.4 by means of iso-immune serum .
Cancer Res. 16, 338-343 (1956).
13. GORER, P.A.:
The antigenic structure of tumors.
Advan. Immunol. 1, 345-393 (1961).
14. GROSS, L.:
Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line.
Cancer Res. 3, 326-333 (1943).
15. GROSS, L.:
Development and serial cellfree passage of a highly potent strain of mouse leukemia virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94, 767-771 (1957).
16. HELLSTRÖM, I.:
A colony inhibition (CI) technique for demonstration of tumor cell destruction by lymphoid cells in vitro.
Int. J. Cancer 2, 65-68 (1967).

17. HELLSTRÖM, I., and K.E. HELLSTRÖM:
Cell-bound immunity to autologous and syngeneic mouse tumors induced by methylcholanthrene and plastic discs.
Science 156, 981-983 (1967).
18. HELLSTRÖM, I., K.E. HELLSTRÖM, and G.E. PIERCE:
In vitro studies of immune reactions against autochthonous and syngeneic mouse tumors induced by methylcholanthrene and plastic disc.
Int. J. Cancer 3, 467-482 (1968).
19. JANOWSKY, D.S., W. ROSENAU, and H.D. MOON:
Isolation of immunologically competent lymphocytes from sensitized mouse spleens.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 115, 77-79 (1964).
20. KLEIN, E.:
Tumor-specific transplantations antigens.
in: Immunopathology 4th Int. Symp., pp. 13-22,
Basel und Stuttgart: Schwabe u. Co. 1966.
21. KLEIN, G., H.O. SJÖGREN, E. KLEIN, and K.E. HELLSTRÖM:
Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in primary autochthonous host.
Cancer Res. 20, 1561-1572 (1960).
22. KLEIN, G., H.O. SJÖGREN, and E. KLEIN:
Demonstration of host resistance against isotransplantation of lymphomas induced by the Gross agent.
Cancer Res. 26, 955-961 (1962).
23. KLEIN, G.:
Some features of tumor-specific antigens: a general discussion.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 101, 170-172 (1962).
24. KREBS, D., and H.-E. STEGNER:
Cell-free transmission of chemically induced tumours in mice.
Oncologia 20, 225-242 (1966).

25. KREBS, D. und H. STOLDT:
Über die Beeinflussung der chemischen Carcinogenese
durch Verabreichung von zellfreien Extrakten aus
chemisch induzierten Tumoren.
Zschr. Krebsforschg. 70, 55-63 (1967).
26. LEJNEVA, O.M., L.A. ZILBER, and E.S. JEVLEVA:
Humoral antibodies of methylcholanthrene sarcomata
detected by a fluorescent technique.
Nature (Lond.) 206, 1163-1164 (1965).
27. LEVINE, A.G., J. REINER, and C.M. SOUTHAM:
Cell-mediated specific immune reactions against
syngeneic mouse tumors in tissue culture.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 9, 142 (1968).
28. MALMGREN, R.A., B.E. BENNISON, and T.W. McKINLEY:
Reduced antibody titers in mice treated with carci-
nogenic and cancer chemotherapeutic agents.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 79, 484-488 (1952).
29. MÖLLER, G.:
Effect on tumour growth in syngeneic recipients of
antibodies against tumour-specific antigens in
methylcholanthrene-induced mouse sarcomas.
Nature (Lond.) 204, 846-847 (1964).
30. OBOSHI, S., K. ITAKURA, and K. MARUYAMA:
Analysis of transplantation antigens in Friend viral
leukemia.
Gann 58, 367-376 (1967).
31. OETTGEN, H.F., L.J. OLD, E.P. McLEAN, and E.A. CARSWELL:
Delayed hypersensitivity and transplantation immunity
elicited by soluble antigens of chemically induced
tumours in inbred guinea-pigs.
Nature (Lond.) 220, 295-297 (1968).
32. OETTGEN, H.F. und W.M. GALLMEIER:
Tumorimmunologie. Einführung und Methodik; Immun-

- reaktionen gegenüber chemisch induzierten Tumoren.
Dtsch. med. Wschr. 93, 1072-1078 (1968).
33. OLD, L.J., B. BENACERRAF, and D.A. CLARKE:
The role of the reticuloendothelial system in the
host reaction to neoplasia.
Cancer Res. 21, 1281-1300 (1961).
34. OLD, L.J., E.A. BOYSE, D.A. CLARKE, and E.A. CARSWELL:
Antigenic properties of chemically induced tumors.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 101, 80-106 (1962).
35. OLD, L.J., E.A. BOYSE, and E. STOCKERT:
Antigenic properties of experimental leukemias.
I. Serological studies in vitro with spontaneous
and radiation-induced leukemias.
J. Nat. Cancer Inst. 31, 977-986 (1963).
36. OLD, L.J., B. BENACERRAF, and E. CARSWELL:
Contact reactivity to carcinogenic polycyclic hydro-
carbons.
Nature (Lond.) 198, 1215-1216 (1963).
37. OLD, L.J., and E.A. BOYSE:
Immunology of experimental tumors.
Ann. Rev. Med. 15, 167-186 (1964).
38. OLD, L.J., E.A. BOYSE, and E. STOCKERT:
Typing of mouse leukaemias by serological methods.
Nature (Lond.) 201, 777-779 (1964).
39. OLD, L.J., E.A. BOYSE, and E. STOCKERT:
The G (Gross) leukemia antigen.
Cancer Res. 25, 813-819 (1965).
40. OLD, L.J., E.A. BOYSE, G. GEERING, and H.F. OETTGEN:
Serologic approaches to the study of cancer in
animal and in man.
Cancer Res. 28, 1288-1299 (1968).

41. PASTERNAK, G., K.-H. HORN und A. GRAFFI:
Immunologische Crossversuche mit Methylcholanthren-
tumoren eines Mäuseinzuchtstammes.
Acta biol. med. germ. 9, 306-308 (1962).
42. PASTERNAK, G.:
Serologic studies on cells of Graffi virus-induced
myeloid leukemia in mice.
J. Nat. Cancer Inst. 34, 71-84 (1965).
43. PASTERNAK, L. und G. PASTERNAK:
Immunologische Charakterisierung von künstlich mit
dem Graffi-Leukämievirus infizierten Sarkomen.
II. Studien zur Differenzierung von viralen und
neuen zellulären Antigenen.
Arch. Geschwulstforschg. 32, 301-308 (1968).
44. PILCH, Y.H., and R.S. RIGGINS:
Antibodies to spontaneous and methylcholanthrene-
induced tumors in inbred mice.
Cancer Res. 26, 871-875 (1966).
45. PREHN, R.T., and J.M. MAIN:
Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas.
J. Nat. Cancer Inst. 18, 769-778 (1957).
46. PREHN, R.T.:
Tumor-specific immunity to transplanted dibenz(a,h)-
anthracene-induced sarcomas.
Cancer Res. 20, 1614-1617 (1960).
47. PREHN, R.T.:
Tumor-specific antigens of putatively nonviral tumors.
Cancer Res. 28, 1326-1330 (1968).
48. RÉVÉSZ, L.:
Detection of antigenic differences in isologous host-
tumor systems by pretreatment with heavily irradiated
tumor cells.
Cancer Res. 20, 443-451 (1960).

49. ROSENAU, W., and D.L. MORTON:
Tumor-specific inhibition of growth of methylcholanthrene-induced sarcomas in vivo and in vitro by sensitized isologous lymphoid cells.
J. Nat. Cancer Inst. 36, 825-836 (1966).
50. SCHRAMM, T., H. BIELKA und A. GRAFFI: in:
Handbuch der experimentellen Pharmakologie XVI/12,
pp. 101-115. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1966
51. SLETTENMARK-WAHREN, B., and E. KLEIN:
Cytotoxic and neutralizations tests with serum and lymph node cells of isologous mice with induced resistance against Gross lymphomas.
Cancer Res. 26, 947-954 (1962).
52. SMITH, H.J.:
Antigenicity of carcinogen-induced and spontaneous tumours in inbred mice.
Brit. J. Cancer 20, 831-837 (1966).
53. SOUTHAM, C.M., S. TANAKA, T. ARATA, D. SIMCOVIC, M. MINRA, and S.F. PETROPULOS:
Enhancement of responses to chemical carcinogens by nononcogenic viruses and antimetabolites.
Progr. exp. Tumor Res. 11, 194-212 (1969).
54. STEFFEN, C.:
Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie.
Thieme Verlag, Stuttgart 1968.
55. STJERNSWÄRD, J.:
Age-dependent tumor-host barrier and effect of carcinogen-induced immunodepression on rejection of isografted methylcholanthrene-induced sarcoma cells.
J. Nat. Cancer Inst. 37, 505-512 (1966).

56. STJERNSWÄRD, J.:
Further immunological studies of chemical carcinogenesis.
J. Nat. Cancer Res. 38, 515-526 (1967).
57. STÜCK, B., L.J. OLD, and E.A. BOYSE:
Antigenic conversion of established leukaemias by an unrelated leukaemogenic virus.
Nature (Lond.) 202, 1016-1018 (1964).
58. STÜCK, B., E.A. BOYSE, L.J. OLD, and E.A. CARSWELL:
ML - a new antigen found in leukaemias and mammary tumours of the mouse.
Nature (Lond.) 203, 1033-1034 (1964).
59. STÜCK, B.:
Nachweis spezifischer Antigene bei experimentellen Leukosen.
Mschr. Kinderheilk. 113, 177-179 (1965).
60. STÜCK, B.:
Nachweis humoraler Antikörper nach isolierter Immunisierung mit einem chemisch induzierten Fibrosarkom der Maus.
Zschr. Krebsforsch. 69, 236-252 (1967).
61. STÜCK, B.:
Immunität und Tumorwachstum im Tierexperiment. In: Probleme der Krebsbekämpfung III/IV. Berlin: Landesausschuß Berlin für Krebsbekämpfung e.V., 1967.
62. STÜCK, B.:
Unveröffentlichte Ergebnisse. (Danach reagierte der BALB/c♀ Meth A-Ascites-Tumor bei ständigen Kontrollen bis heute nicht mit G-Antiseren.)

Meinem geschätzten Lehrer, Herrn Professor
Dr. med. Burghard Stück möchte ich danken
für die Überlassung des Themas, für die nütz-
lichen Anregungen, für die kollegiale Zusam-
menarbeit und für seine allzeitige Bereit-
schaft zur Diskussion.

Fräulein Frauke Oberbeck danke ich für ihre
wertvolle Mitarbeit bei der Durchführung der
Versuche.

L e b e n s l a u f

Am 26.Mai 1940 wurde ich, Bernd Muzzulini, als Sohn der Eheleute Wilhelm und Hildegard Muzzulini in Stuttgart geboren.

Nach zehnjährigem Schulbesuch und Abschluß der Mittleren Reife 1956 in Stuttgart absolvierte ich eine Lehre als Elektromechaniker, die 1959 mit der Facharbeiterprüfung abschloß. Danach folgte ein erneuter Schulbesuch an der Technischen Oberschule in Stuttgart; 1962 bestand ich dort das Technische Abitur. Im Frühjahr 1963 legte ich beim Oberschulamt Nordwürttemberg zusätzlich die allgemeine Reifeprüfung ab.

Zum Sommersemester 1963 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Universität Heidelberg, wo ich nach zwei Semestern die naturwissenschaftliche und nach fünf Semestern die ärztliche Vorprüfung ablegte. Ab Wintersemester 1965/66 studierte ich an der Freien Universität Berlin. Im März 1969 bestand ich die ärztliche Prüfung in Berlin.

Die Approbation als Arzt erhielt ich nach Ableistung der Medizinalassistentenzeit am 1.Juli 1970 vom Senator für Arbeit, Gesundheit und Soziales in Berlin ausgestellt. Seit Oktober 1970 arbeite ich als Assistenzarzt auf der chirurgischen Abteilung des Städtischen Behring-Krankenhauses in Berlin-Zehlendorf.

Ab 1968 führte ich an der Universitäts-Kinderklinik und -Poliklinik der Freien Universität Berlin unter Leitung von Professor Dr. med. Stück die vorliegende Arbeit durch.

